

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

554194

(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/095024 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/53, 33/533, C12Q 1/68, C07K 19/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003433
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 15 日 (15.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-120253 2003 年 4 月 24 日 (24.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅澤 喜夫 (UMEZAWA, Yoshio) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都新宿

区 市ヶ谷薬王寺町 4 5-1-2 0 3 Tokyo (JP). 佐藤 守俊 (SATO, Moritoshi) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都文京区向丘 2-8-4-7 0 1 Tokyo (JP).

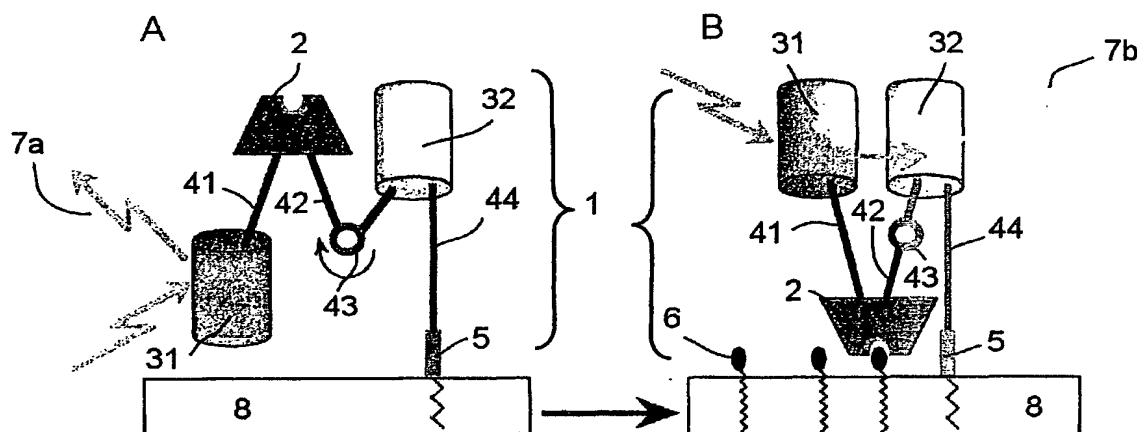
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山 6 丁目 1 番 1 号 スリーエフ南青山ビルディング 7 F Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

[続葉有]

(54) Title: PROBE FOR DETECTING AND QUANTIFYING LIPID SECOND MESSENGER AND METHOD OF DETECTING AND QUANTIFYING LIPID SECOND MESSENGER USING THE SAME

(54) 発明の名称: 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブとそれを用いた脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法



(57) Abstract: It is intended to provide a probe for detecting and quantifying a lipid second messenger characterized by having a polypeptide specifically binding to the lipid second messenger, two chromophores being bonded to both terminals of the polypeptide via rigid linker sequences and having fluorescent wavelengths differing from each other, and a membrane localized sequence bonded to one of the chromophores via a rigid linker sequence. Use of this probe makes it possible to quantitatively detect a lipid second messenger, i.e., clarifying the production site and the production time thereof in living cells.

(57) 要約: 脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に、剛直なリンカー配列を介して連結された異なる蛍光波長を有する二つの発色団と、一方の発色団と剛直なリンカー配列を介して連結された膜局在化配列を有することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。これにより、脂質セカンドメッセンジャーが生細胞内のどの部位で、いつ、産生されたかを定量的に検出することが可能になる。

WO 2004/095024 A1



SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブと

それを用いた脂質セカンドメッセンジャーの

5 検出および定量方法

## 技術分野

この出願の発明は、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブに関するものである。さらに詳しくは、この出願の  
10 発明は、脂質セカンドメッセンジャーが生細胞内のどこで、いつ、産生されたかを定量的に検出するための脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブとそれを用いた脂質セカンドメッセンジャーの検出・定量方法に関するものである。

## 15 背景技術

脂質セカンドメッセンジャーの一つであるホスファチジルイ  
ノシトール-4, 5-二リン酸 ( $\text{PIP}_3$ ) は、細胞膜に存在し、細胞内  
シグナル伝達において重要な役割を果たしている。具体的には、  
Akt、PDK1、および Btk 等の結合タンパク質を活性化し、アポト  
20 ーシス、糖尿病、癌等に関係する様々な細胞機能を調節するこ  
とが知られている (Cantley, L. C. (2002) *Science*, 296,  
1655-1657. ; Czech, M. P. (2000) *Cell*, 100, 603-606. ;  
Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R. (2000) *Biochem. J.*,  
346, 561-576.)。  $\text{PIP}_3$  等の脂質セカンドメッセンジャーは、細  
25 胞膜において、ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ  
(PI3K) により触媒されて産生されることが明らかになってお

り (Wymann, M. P. and Pirola, L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1436, 127-150.), PI3K が多くの刺激により活性化されることも知られている。しかし、細胞膜のどの部分で、いつ、どのようにして PIP<sub>3</sub> が産生されるのかは明らかになっていない。

- 5 その大きな原因の一つとして、生細胞における PIP<sub>3</sub> の空間的および時間的な動態を定量的に分析するための適当な方法がないことが挙げられる。

従来、PIP<sub>3</sub> の変化は、[<sup>32</sup>P] オルトリン酸を用いた細胞の標識により広く測定されてきた。しかし、このような方法では、充分な放射化学的シグナルを得るために数百万個の細胞を粉砕し、  
10 分析しなければならないという問題があった。また、最近になって、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と、Btk (Varnai, P., Rother, K. I. and Balla, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 10983-10989.), GRP1 (Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F.,  
15 Tavaré, J. M. and Cullen, P. J. (1998) *Biochem. J.*, 335, 139-146.), ARNO (Venkateswarlu, K., Oatey, P. B., Tavaré, J. M. and Cullen, P. J. (1998) *Curr. Biol.*, 8, 463-466.), または Akt (Watton, J and Downward, J. (1999) *Curr. Biol.*, 433-436.) 由来の PIP<sub>3</sub> 結合ドメインとの融合タンパク質が、細胞膜における PIP<sub>3</sub> 蓄積のための指示薬として作用することが報告され、このような指示薬では細胞質ゾルから細胞膜への該融合タンパク質の転位が PIP<sub>3</sub> の蓄積を反映するとされている。しかしながら、このような方法では、細胞の形状変化や細胞膜のラフリングなどの影響を受けやすく、PIP<sub>3</sub> に無関係な対象に  
20 応答しやすいという問題があった。さらに、このような蛍光融合タンパク質では、細胞内のどの膜に融合タンパク質が転位する

のかを識別することが困難であるという問題もあった。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、PIP<sub>3</sub>に代表される脂質セカンドメッセンジャーが生細胞内のどの部位で、いつ、产生されたかを定量的に検出するためのプローブを提供することを課題としている。また、この出願の発明は、このようなプローブを用いて細胞内脂質セカンドメッセンジャーによるシグナリングに影響を与える物質をスクリーニングする方法や疾病に関連したシグナルの測定による診断方法をも提供する。

10

## 発明の開示

この出願の発明は、以上のとおりの課題を解決するものとして、第1には、脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に、剛直なリンカー配列を介して連結された異なる蛍光波長を有する二つの発色団と、一方の発色団と剛直なリンカー配列を介して連結された膜局在化配列を有することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提要する。

この出願の発明は、第 2 には、脂質セカンドメッセンジャー  
20 に特異的に結合するポリペプチドが脂質セカンドメッセンジャー  
結合タンパク質である脂質セカンドメッセンジャー検出・定  
量用プローブを、また、第 3 には、脂質セカンドメッセンジャー  
結合タンパク質が GRP1 のプレクストリン相同ドメインである  
脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。

25 さらに、第4には、この出願の発明は、発色団がポリペプチ  
ドのN-末端に連結されたシアン蛍光タンパク質と、C-末端

に連結された黄色蛍光タンパク質である前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。

この出願の発明は、第5には、リンカー配列が配列番号1の配列の繰り返しからなる剛直な $\alpha$ -ヘリックス状リンカーである前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャーを、第6には、  
5 少なくとも1つのリンカー配列がジグリシンモチーフを有する前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。

また、この出願の発明は、第7には、膜局在化配列が脂質化配列又は膜貫通配列である前記いずれかの脂質セカンドメッ  
10 センジャー検出・定量用プローブを提供する。

この出願の発明は、さらに、第8には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させ、蛍光波長の変化を測定することを  
15 特徴とする脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法を提供する。

この出願の発明は、第9には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、脂質セカンドメッセンジャー検出・定  
20 量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させる脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法を、第10には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはそ  
25 の子孫動物の全細胞において脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブと脂質セカンドメッセンジャーを共存させ

る脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法を提供する。

この出願の発明は、さらに、第 1 1 には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法において、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブが細胞内で膜に固定化され、該膜において産生される脂質セカンドメッセンジャーを検出・定量する脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法をも提供する。

この出願の発明は、第 1 2 には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物を提供する。

そして、この出願の発明は、第 1 3 には、前記非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における脂質セカンドメッセンジャーを定量する物質のスクリーニング方法をも提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、この発明の脂質セカンドメッセンジャー可視化プローブの構成を例示した概略模式図である。

図 2 は、この発明の実施例において、作製された各種の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの構成を示した概略模式図である。(a : Fllip-pm、b : Fllip-pmR284C、c : Fllip-del、d : Fllip-em)

図 3 は、この発明の実施例において、CHO 細胞に局在化された

Fllip-pm の蛍光顕微鏡像を示した写真である。(a および c : 垂直方向、b : 水平方向)

図 4 は、この発明の実施例において、CHO 細胞に局在化された Fllip-em の共焦点レーザー走査型顕微鏡像を示した写真である。

- 5 (a : 抗 GFP 抗体により Cy5 を染色、b : ゴルジ体マーカである BODIPY-セラミド C5 で染色、c : 小胞体マーカであるブレフェルジン A で染色、d : a ~ c の重ね合わせ)

- 図 5 は、この発明の実施例において、CHO 細胞における Fllip-pm の FRET 応答 (25℃、440±10 nm で励起させた CFP (480±15 nm) 度と YFP (535±12.5 nm) の発光強度の比) の経時変化を示した図である。(矢印 : 合成 PIP<sub>3</sub> (1 μl) 添加)

- 図 6 は、この発明の実施例において、Fllip-pm 発現 CHO-PDGFR 細胞に PDGF (50 ng/mL) を添加した際の、CFP/YFP 発光比の経時変化を示した図である。(矢印/波線 : PDGF (50 ng/mL) 添加、a : PDGF 添加、b : Wortmannin 処理後 PDGF 添加)

図 7 は、この発明の実施例において、Fllip-pm 発現 CHO-PDGFR 細胞に PDGF (50 ng/mL) を添加した際の、添加後の経過時間毎の蛍光顕微鏡写真を示した写真である。(a : 0 秒、b : 100 秒、c : 300 秒、d : 500 秒)

- 図 8 は、この発明の実施例において、Fllip-pmR284C 発現 CHO-PDGFR 細胞および Fllip-del 発現 CHO-PDGFR 細胞に PDGF (50 ng/mL) を添加した際の、CFP/YFP 発光比の経時変化を示した図である。(矢印/波線 : PDGF (50 ng/mL) 添加、a : Fllip-pmR284C、b : Fllip-del)

- 図 9 は、この発明の実施例において、Fllip-em 発現 CHO-PDGFR 細胞に PDGF (50 ng/mL) を添加した際の、添加後の経過



時間毎の蛍光顕微鏡写真（25℃）を示した写真である。（a : 0 秒、b : 120 秒、c : 300 秒、d : 600 秒）

図 1 0 は、この発明の実施例において、Fllip-em 発現 CHO-PDGFR 細胞および Fllip-pm 発現 CHO-PDGFR 細胞に PDGF（50 ng/mL）を添加した際の、CFP/YFP 発光比の経時変化を示した図である。（矢印／波線：PDGF（50 ng/mL）添加、a : Fllip-em、b : Fllip-pm）

図 1 1 は、この発明の実施例において、DynK44A 発現 CHO-PDGFR 細胞を PDGF（50 ng/mL）により刺激した際の、内膜における CFP/YFP 発光比の経時変化を示した図である。（矢印／波線：PDGF（50 ng/mL）添加、a : DynK44A 発現なし（小胞体刺激）、b : DynK44A 発現（PDGF 刺激）、c : DynK44A 発現なし（PDGF 刺激））

図 1 2 は、この発明の実施例において、DynK44A 発現 CHO-PDGFR 細胞を PDGF（50 ng/mL）により刺激した際の、形質膜における CFP/YFP 発光比の経時変化を示した図である。（矢印／波線：PDGF（50 ng/mL）添加、a : DynK44A 発現、b : DynK44A 発現なし）

図 1 3 は、この発明の実施例において、Fllip-em を用いて PTP1B を過剰発現させた CHO-PDGFR 細胞に PDGF を添加した際の内膜における CYP/YFP 発光強度比の経時変化を示した図である。（矢印／波線：PDGF（50 ng/mL）添加、a : PTP1B 過剰発現、b : PTP1B 過剰発現なし）

図 1 4 は、この発明の実施例において、Fllip-em を用いて PTP1B を過剰発現させた CHO-PDGFR 細胞に PDGF を添加した際の形質膜における CYP/YFP 発光強度比の経時変化を示した図であ

る。(矢印／波線：PDGF (50 ng/mL) 添加、a：PTP1B 過剰発現、  
b：PTP1B 過剰発現なし)

なお、図中の符号は、次のものを示す。

- A 脂質セカンドメッセンジャー非共存下
- 5 B 脂質セカンドメッセンジャー共存下
- 1 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ
- 2 脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位
- 31 発色団 (CFP)
- 32 発色団 (YFP)
- 10 41 剛直なリンカー配列
- 42 剛直なリンカー配列
- 43 柔軟な部位
- 44 剛直なリンカー配列
- 5 膜局在化配列
- 15 6 脂質セカンドメッセンジャー
- 7a 脂質セカンドメッセンジャー非共存下の発光
- 7b 脂質セカンドメッセンジャー共存下の発光
- 8 膜

## 20 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用  
プローブは、各々異なる機能を有する3つの部位からなるもの  
である。つまり、この脂質セカンドメッセンジャー検出・定量  
用プローブは、選択的に脂質セカンドメッセンジャーを認識す  
る脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位と、脂質セカンド  
25 メッセンジャー特異結合部位の脂質セカンドメッセンジャー認

識を光学的に信号発信する発色部位と、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを膜に固定化させるための膜固定化部位からなるものである。

- 図 1 にこの出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの概略模式図を示した。この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) と共存したとき、脂質セカンドメッセンジャーと特異的に結合する部位 (以下、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位) (2) が脂質セカンドメッセンジャー (6) と結合し、その際に生じる発色部位 (31、32) の立体配座の変化が、光学的変化 (7a、7b) として現れるという原理によるものであり、この光学的変化 (7a、7b) を測定することにより、脂質セカンドメッセンジャー産生の部位や時間を特定し、定量できるものである。
- 脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) は、例えば、種々の脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質等のポリペプチドである。脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質としては、検出・定量される脂質セカンドメッセンジャー (6) がホスファチジルイノシトール-3, 4, 5-三リン酸 ( $\text{PIP}_3$ ) の場合には、GRP1 のプレクストリン相同ドメイン (以下 PH ドメイン) (Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Tavare, J. M. and Cullen, P. J. (1998) *Biochem. J.*, 335, 139-146.)、ARNO の PH ドメイン、Btk の PH ドメイン等が、ホスファチジルイノシトール-3, 4-二リン酸 ( $\text{PI}(3, 4)\text{P}_2$ ) の場合には、TAPP の PH ドメイン等が、ホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 ( $\text{PI}(4, 5)\text{P}_2$ ) の場合には、PLC  $\delta$  の PH ドメイン等が、ホスファ

チジルイノシトール-3-リン酸 (PI(3)P) (Misra, S., Miller, G. J. and Hurley, J. H. (2001) *Cell*, 107, 559-562.) の場合には、p40phox の PX ドメインや EEA1-2x の FYVE ドメインが、  
5 ジアシルグリセロール (Zhang, C., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M. and Hurley, J. H. (1995) *Cell*, 81, 917-924.) の場合には、PKC の C1 ドメイン等が好ましく例示される。

もちろん、脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) と特異的に結合するポリペプチドであれば、これらに  
10 限定されず、合成および天然のあらゆるペプチド鎖を用いることができる。

この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) において、分子認識の結果を光学的変化として発信する部位としては、種々の発色団 (31、32) が考慮される。  
15 このとき、発色団 (31、32) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) の結合により生じる脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) の立体構造の変化に応答して精度高く波長変化を生じなければならない。生化学の分野においては、一般的に種々の蛍  
20 光発色団が用いられるが、立体構造の変化に敏速に応答するものとしては、蛍光共鳴エネルギー移動 (以下、FRET) (Miyawaki, A. and Tsien, R. Y. (2000) *Method. Enzymol.*, 327, 472-500. ; Sato, M., Hida, N., Ozawa, T., and Umezawa, Y. (2000) *Annal. Chem.*, 72, 5918-5924. ; Sato, M., Ozawa, T.,  
25 Inukai, K., Asano, T. and Umezawa, Y. (2002) *Nature Biotechnol.*, 20, 287-294.) の生起により色調に変化を来たす

発色団がある。

したがって、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー  
検出・定量用プローブ（１）においては、分子認識の結果を光学的  
変化として発信する部位として、異なる蛍光波長を有する二  
5 つの蛍光発色団（３１、３２）を、各々脂質セカンドメッセンジャー  
特異結合部位（２）の両末端にそれぞれ連結する。このような  
蛍光発色団としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）のブルーシフト  
変異タンパク質であるシアン蛍光タンパク質（CFP）や、GFP  
のレッドシフト変異タンパク質である黄色蛍光タンパク質  
10 （YFP）が例示される。このとき、CFP（３１）を脂質セカンドメ  
ッセンジャーと特異的に結合するポリペプチドの N-末端に、YFP  
（３２）を C-末端に連結することにより、それぞれドナーおよび  
アクセプターとして作用し、FRET を生起する。もちろん、発色  
団はこれらに限定されず、FRET のドナー／アクセプターとして  
15 作用する各種のものが適用できる。

また、脂質セカンドメッセンジャー（６）は、形質膜、内膜等  
の膜（８）で産生されることから、この出願の発明の脂質セカ  
ンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）は、末端に脂質セ  
カンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を膜に固定化  
20 するための膜局在化配列（５）を有する。このような膜局在化配  
列（５）は、いずれか一方の発色団（３２）に連結されており、脂  
質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を膜  
（８）に固定化させるものである。具体的には、細胞膜に対して  
は、K-Ras や N-Ras 等の脂質化配列（Resh, M. D. (1996) *Cell*.  
25 *Signal.*, 8, 403-412.) や膜貫通配列が例示される。もちろん、  
検出する脂質セカンドメッセンジャー（６）あるいは固定化させ

たい膜（８）に応じて、膜局在化配列（５）を適宜選択すれば、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を形質膜や内膜に対してのみならず、核の内膜、あるいはミトコンドリアの外膜等の他の細胞小器官膜に対しても固定化できる。具体的には、小胞体膜やゴルジ体膜に対しては、N-Ras の C181S 変異体や N-Ras の C181 変異体-eNOS、ミトコンドリア膜に対しては、Tom20、カベオラに対しては、caveolin、ラフトに対しては、Cbp が例示される。さらに、その他の核膜やペルオキシソーム膜などのオルガネラ膜上の脂質セカンドメッセンジャー（６）も、それぞれのオルガネラ膜に局在するタンパク質内の局在化配列を導入すれば固定化できる。

この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）が細胞内に導入されると、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）は、細胞膜（８）に固定化されるが、このとき脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）は二つの発色団（３１、３２）が離れた立体配座をとる（Ａ）。しかし、細胞膜（８）中で脂質セカンドメッセンジャー（６）が産生されると、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位（２）がそれを認識し、結合が生じて脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）の立体配座が反転する。これにより二つの発色団（３１、３２）が近接して FRET を生起する（Ｂ）。

このような機構により FRET が生起し、脂質セカンドメッセンジャー（６）の検出を光学的変化として発信するためには、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）における異なる蛍光波長を有する二つの蛍光発色団（３１、３２）は、脂質セカンドメッセンジャー（６）非共存下では、立体的に離れた位置

にあり、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位（2）と脂質セカンドメッセンジャー（6）の結合により敏速に立体配座が反転する必要がある。そのため、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位（2）と蛍光発色団（31、32）は、剛直なリンカー配列（41、42）、例えば EAAAR（配列番号 1）の繰り返し配列からなる剛直な  $\alpha$ -ヘリックス状リンカー（Merutka, G., Shalongo, W. and Stellwagen, E. (1991) *Biochemistry*, 30, 4245-4248.）を介して連結していなければならない。

さらに、このような剛直なリンカー配列（41、42）において、少なくとも一つは、蝶番のような働きをする柔軟な部位（43）を有することが望ましい。これにより、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（1）が細胞膜（8）に固定化された際に、脂質セカンドメッセンジャー（6）非共存下では、二つの発色団（31、32）が離れた立体配座をとり、細胞膜（8）中で脂質セカンドメッセンジャー（6）が産生され、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位（2）と脂質セカンドメッセンジャー（6）の結合が生じた際には、立体配座が反転して二つの発色団（31、32）が近接できるようになる。このように蝶番様の作用を示す柔軟な部位（43）は、側鎖の小さいアミノ酸数個からなるものであればよく、具体的にはジグリシンモチーフが例示される。

また、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（1）において、前記の膜局在化配列（5）と蛍光発色団（32）についても、同様の剛直なリンカー配列（44）を介して結合しているものとする。さらに、膜局在化配列（5）は、いずれの発色団（31、32）に連結されていてもよいが、脂

質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) が細胞膜 (8) に固定化された際に、好ましい立体配座をとるためには、前記の蝶番様の柔軟な部位 (43) を有するリンカー配列 (42) によって脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) に連結された方の発色団 (32) に連結することが望ましい。

以上のとおりのこの出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) と共存するとき、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) と脂質セカンドメッセンジャー (6) の結合が起こり、N-および C-末端のそれぞれの蛍光発色団 (31、32) による FRET が生起して、蛍光波長の変化が生じるものである。したがって、この蛍光変化を通常行われる種々の化学的あるいは生化学的分析方法を用いて測定することにより、脂質セカンドメッセンジャー (6) を検出することが可能となるのである。また、蛍光強度と脂質セカンドメッセンジャー (6) の量の関係を予め検量することにより、試料における脂質セカンドメッセンジャーを定量することもできるのである。

この出願の発明では、以上のとおりの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) と脂質セカンドメッセンジャー (6) を共存させる方法としては、様々な方法が考えられる。例えば、細胞を破壊して、細胞内から脂質セカンドメッセンジャーを溶出させ、その溶液に脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を添加して、脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を共存させる方法があげられる。このような方法で脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー検



出・定量用プローブ（１）を共存させる場合には、予め脂質を供給してリボソーム膜を形成させ、そのリボソーム膜上に脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を局在化させることにより、脂質セカンドメッセンジャー（６）を *in vitro* で検出・定量できる。

また、この出願の発明では、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を組み込んだ発現ベクターを個々の培養細胞に導入する方法により、脂質セカンドメッセンジャー（６）と脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を共存させることができる。発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターが好ましく用いられる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入する方法としては、電気穿孔法、リン酸化カルシウム法、リボソーム法、DEAE デキストラン法等の公知の方法を採用することができる。このように、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入する方法を用いることにより、脂質セカンドメッセンジャー（６）と脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）が細胞内で共存できる。したがって、細胞を破壊することなく、脂質セカンドメッセンジャー（６）の検出および定量をする *in vivo* 法が可能となる。

さらに、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャーの検出および測定方法では、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（１）と脂質セカンドメッセンジ

5 ヤー（6）を共存させることもできる。このとき、細胞内で発現された脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（1）は、細胞内の任意の膜に固定化され、その膜において産生される脂質セカンドメッセンジャー（6）を検出・定量できるようになる。

この出願の発明では、以上のとおりの各種方法により、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（1）を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、全細胞において脂質セカンドメッ  
10 センジャー検出・定量用プローブ（1）と脂質セカンドメッセンジャー（6）が共存しているトランスジェニック非ヒト動物が得られる。トランスジェニック非ヒト動物は、公知の作成法（例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77; 7380-7384, 1980）に従って作製することができる。このようなトランスジェニック  
15 非ヒト動物は、すべての体細胞に脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを保有しているため、例えば、その体内に医薬品や毒物などの検査物質を導入し、細胞および組織における脂質セカンドメッセンジャーの濃度を測定することによって、様々な物質のスクリーニングを行うことができる。

20 以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

## 25 実施例

### [準備]

## (1) 試薬

以下の実施例において、各材料および試薬は次のものを使用した。

合成  $PIP_3$ 、L- $\alpha$ -ホスファチジル-D-myo-イノシトール-3, 4, 5-  
5   三リン酸 (Dic16) は、和光純薬工業 (日本、大阪市) から購入した。

ハム F-12 培地、ウシ胎児血清、ハンクス液、およびリポフェクトアミン (LipofectAMINE) 2000 試薬は、ライフ・テクノロジー (メリーランド州、ロックビル) 製のものを用いた。

10   ダルベッコ変法イーグル培養液および PDGF-BB は、シグマ・ケミカル社 (ミズーリ州、セントルイス) から購入した。

抗 GFP 抗体はクロンテック (カリフォルニア州、パロアルト) から購入した。

Cy5 標識抗ウサギ IgG 抗体は、Jackson ImmunoResearch Lab,  
15   Inc. (ペンシルバニア州、ウェストグロブ) から入手した。

BONIPY-セラミド C5 およびブレフェルジン A は、Molecular Probes Inc.- (オレゴン州、ユージーン) から購入した。

CFP 突然変異は、F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A/N212K、  
YFP 突然変異は、S65G/V68L/Q69K/S72A/T203Y とした。

20   使用された他の化学物質は、すべて分析試薬等級とした。

## (2) プラスミド構築

脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの cDNA を構築するべく、CFP、リンカー配列 (Ln1 および Ln2) を有する PHD、リンカー配列 (Ln3) と膜局在化配列 (MLS1) を有する YFP、  
25   リンカー配列 (Ln1 および Ln2) を有する PHD-R284C (PHD の 84 番目の R が C に変換されたもの)、リンカー配列 (Ln3) を有す

る YFP（以下 YFP-Ln3）、およびリンカー配列（Ln3）と膜局在化配列（MLS2）を有する YFP のフラグメント cDNA は、標準的な PCR により生成した。

各々は pBluescript SK (+) へサブクローニングされた。クロー  
5 ニング酵素は、すべて宝酒造（日本、東京都）のものを、製造業者の使用説明書に従って使用した。

PCR フラグメントは、ABI310 ジェネティック・アナライザーにより配列決定した。

脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブをコード  
10 している各 cDNA は、哺乳類の発現ベクター、pCDNA3.1 (+)（Invitrogen Co.、カリフォルニア州、カールズバート）の Hind III および XhoI 部位にサブクローニングされた。

〔実施例 1〕 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プロ  
15 ープの作成

図 1 に示されるように、ヒト GRP1 (261-382) 由来の PHD の N-末端にリンカーLn1（配列番号 2）を介して発光オワンクラゲ（*Aequorea victoria*）由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）（例えば、*Current Biology* 6 (2); 178-182, 1996）の変異タンパク質  
20 である、シアン蛍光タンパク質（CFP）を、また、C-末端にリンカーLn2（配列番号 3）を介して黄色蛍光タンパク質（YFP）をそれぞれ遺伝子工学的に連結し、さらに、YFP の C-末端にリンカーLn3（配列番号 4）を介して N-Ras（Choy, E. et al. (1999) *Cell*, 98, 68-80.）の CAAX ボックスモチーフを膜局在  
25 化配列 MLS1（配列番号 5）として連結して、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ（1）（以下、Flipip-pm とす

る)を作成した。

また、この脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) において、PHD のアミノ酸配列を全長有するもの (図 2 a) の他に、同様の方法により、PHD の 284 番目のアルギニン残基をシステインに変換し、PIP<sub>3</sub> と結合しないようにしたもの (以下、Fllip-pmR284C とする) (図 2 b)、膜局在化配列 MLS1 を有さないもの (以下、Fllip-del とする) (図 2 c)、および膜局在化配列を MLS1 から MLS2 (配列番号 6) に変換したもの (以下、Fllip-em とする) (図 2 d) を作製した。

10

〔実施例 2〕 CHO-PDGFR 細胞への脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (CGY) の導入

チャイニーズハムスターの卵巣細胞 (CHO) を 10 %ウシ胎児血清 (FCS) を補充した Ham の F-12 培養液中、37℃、5 %CO<sub>2</sub> 下で培養した。得られた CHO-PDGFR 細胞をガラス底培養皿に塗布し、LipofectAMINE2000 試薬 (ライフテクノロジー社製) により 37℃、5 %CO<sub>2</sub> 下で 24 時間、Fllip-pm、Fllip-pmR284C、Fllip-del、および Fllip-em 発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入した。

20 〔実施例 3〕 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを導入された CHO-PDGFR のイメージング

(1) Fllip-pm

無血清培養液で血清不足にした後、培養液を Hank の平衡塩類溶液で置換した。

25 次に、発明者らによりすでに報告されている方法 (例えば、非特許文献 1 2、1 3) に基づき、室温下で、カール・ツァイ

ス・アクシオパート 135 顕微鏡上で、MetaFluor (ユニバーサル・イメージング製) (ペンシルベニア州、ウェスト・チェスター) により制御された冷却 CCD カメラ MicroMAX (ローパー・サイエンティフィック製) (アリゾナ州、ツーソン) を用いて細胞  
5 を撮像した。

蛍光イメージは  $480 \pm 15$  nm および  $535 \pm 12.5$  nm のフィルターを通した 40 倍の油浸系対物レンズ (カール・ツァイス製) (ドイツ、イエナ) により検出した。YFP イメージは、共焦点レーザー走査型顕微鏡 LSM 510 (カール・ツァイス製) により検出され  
10 た。

図 3 に、CHO 細胞における Fllip-pm のの顕微鏡像を示した (a および c : 垂直方向、b : 水平方向)。これより Fllip-pm は、主として CHO-PDGFR 細胞の形質膜に局在化することが確認された。

## 15 (2) Fllip-em

次に図 4 に、CHO 細胞における Fllip-em の顕微鏡像を示した (a : 抗 GFP 抗体により Cy5 を染色、b : ゴルジ体マーカである BODIPY-セラミド C5 で染色、c : 小胞体マーカであるブレフェルジン A で染色、d : a ~ c の重ね合わせ)。

20 MLS1 における 181 番目のシステインがセリンで置換された変異体を膜局在化配列として用いた Fllip-em では、蛍光は内膜、すなわち小胞体 (ER) およびゴルジ体に局在していた。

[実施例 4] 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プロ  
25 ープの応答性 (Fllip-pm 発現 CHO 細胞における合成  $\text{PIP}_3$  添加)  
実施例 1 で作成された各脂質セカンドメッセンジャー検出・

定量用プローブを、脂質セカンドメッセンジャー $\text{PIP}_3$ の合成品  
( $1\mu\text{M}$ )でマイクロインジェクション法により刺激し、デュアル  
エミッション蛍光顕微鏡で蛍光を測定した。

図5に、CHO細胞におけるFllip-pmのFRET応答、すなわち、  
5 25℃、 $440\pm 10\text{ nm}$ で励起させたCFP( $480\pm 15\text{ nm}$ )の発光強度と  
YFP( $535\pm 12.5\text{ nm}$ )の発光強度の比の経時変化を示した。

図5より、Fllip-pmのCFP/YFP発光比は、合成 $\text{PIP}_3$ ( $1\mu\text{l}$ )  
の添加により急速に減少し、一定値に達することが確認された。  
これより、CFPからYFPへのFRETが、 $\text{PIP}_3$ に比例して増大する  
10 ことが示された。したがって、Fllip-pmを用いて形質膜におけ  
る $\text{PIP}_3$ の動態を可視化できることが示唆された。

〔実施例5〕 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プロ  
ープの応答性 (Fllip-pm発現 CHO-PDGFR細胞におけるPDGF刺  
15 激)

次に、生理的刺激により産生された $\text{PIP}_3$ に対するFllip-pmの  
応答性を調べた。

まず、Fllip-pmを、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)を安  
定に発現するCHO-PDGFR細胞に発現させた。血小板由来増殖因  
20 子(PDGF)は、形質膜におけるPDGFRの二量体化を促進し、そ  
れによりPDGFRを活性化させ、PDGFRに存在する多数のチロシン  
残基をリン酸化する。PI3Kは、Src相同2(SH2)ドメインを介  
してこれらのチロシルリン酸化部位に漸化され、それにより活  
性化される(Schlessinger, J. (2000) *Cell*, 103, 211-225.)。  
25 PDGF( $50\text{ ng/mL}$ )を形質膜にFllip-pmを発現している明るい  
細胞に添加した際の、CFP/YFP発光比の経時変化を図6および図

7 に示した。

図 6 a より、PDGF (50 ng/mL) の添加により、直ちに CFP/YFP 発光比が減少し、300 秒以内に一定に達することが確認された。

一方、PI3K の特異的阻害剤である、ウォルトマンニン 100 nM  
5 を用いて同細胞を前処理し、同様に PDGF を添加したところ、PDGF 刺激に対する Fllip-pm の FRET 応答が完全に消失することが確認された (図 6 b)。

以上より、Fllip-pm は、形質膜において生理的に産生された PIP<sub>3</sub> のレベルを検出できることが確認された。

10

[比較例 1] 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの応答性

(1) Fllip-pmR284C 発現 CHO-PDGFR 細胞における PDGF 刺激

実施例 4 および 5 と同様の方法により、PHD が PIP<sub>3</sub> と結合し  
15 ないように突然変異された Fllip-pmR284C の応答性について検討した。

PDGF (50 ng/mL) を、形質膜に Fllip-pmR284C (図 2 b) を発現した細胞に添加した際の、CFP/YFP 発光比の経時変化を図 8 a に示した。

20 公知文献 (Venkateswarlu, K., Cunn-Moore, F., Tavaré, J. M. and Cullen, P. J. (1999) *J. Cell Sci.*, 112, 1957-1965.) に記載されるように、Fllip-pmR284C は、PDGF 刺激に対して応答を示さなかった。これより、Fllip-pm の FRET 応答は、PHD が膜において PIP<sub>3</sub> を認識したことによることが確認された。

25 (2) Fllip-del 発現 CHO-PDGFR 細胞における PDGF 刺激

さらに、膜局在化配列 (MLS) が欠失している Fllip-del (図



2 d) を形質膜に発現した細胞に、PDGF (50 ng/mL) を添加した際の CFP/YFP 発光比の経時変化を図 8 b に示した。

Fllip-del は、PDGF 刺激に対し何ら応答を示さなかった。

5 これより、MLS が、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを細胞膜に固定化させるためだけでなく、膜における脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの反転型構造変化を生起する上でも重要な役割を果たしていることが示された。

10 [実施例 6] 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの応答性 (Fllip-em 発現 CHO-PDGFR 細胞における PDGF 刺激)

次に、実施例 3 (2) において、内膜内に局在化されることが確認された Fllip-em を用いて、内膜、すなわち小胞体および  
15 ゴルジ体における  $PIP_3$  動態を可視化した。

まず、実施例 2 と同様の方法により、Fllip-em を CHO-PDGFR 細胞に発現した。次に実施例 5 と同様の方法により細胞を PDGF で刺激し、CFP/YFP 発光比の経時変化を測定した。結果を図 9 および図 10 に示した。

20 Fllip-em の、CFP/YFP 発光比は PDGF 刺激により直ちには変化しなかった (図 10 a)。一方、形質膜における Fllip-pm は直ちに応答を示した (図 10 b)。しかし、100~150 秒後では、Fllip-em の内膜における CFP/YFP 発光比は減少し、500 秒以内に一定値に達することが確認された (図 3 a)。

25 これより、PDGF 刺激により、形質膜のみならず、内膜においても  $PIP_3$  が増加することが示された。また、内膜における  $PIP_3$

の増加が、形質膜におけるそれよりも 2~3 倍大きいことが明らかになった。

なお、本発明者らは、他のペプチドリガンド、インスリン、および上皮増殖因子を用いた場合にも、同様に形質膜および内  
5 膜における  $\text{PIP}_3$  の増加が誘導されることを確認している。

#### [実施例 7]

そこで、刺激に際する内膜での実質的な  $\text{PIP}_3$  の増加が形質膜  
でのそれと、どのような点で異なるのか、その機構を解明する  
10 ことを検討した。

内膜における  $\text{PIP}_3$  増加の分子機構を調べるため、リジン 44  
がアラニンで置換された dynamin のドミナントネガティブな変  
異体 (DynK44A) (Vieria, A. V., Lamaze, C. and Schmid, S.  
L. (1996) *Science*, 274, 2086-2089.) の、 $\text{PIP}_3$  増加に対する  
15 影響を検討した。

Dynamin はグアノシントリホスファターゼ (GTPase) であり、  
PDGFR を含む受容体チロシンキナーゼのクラスリン介在性エンド  
サイトーシスを調節する (Qualmann, B., Kessels, M. M. and  
Kelly, R. B. (2000) *J. Cell Biol.*, 150, F111-F116.) が、  
20 DynK44A は GTPase 活性を欠いており、PDGFR のクラスリン介在  
性エンドサイトーシスを阻害する。

アデノウイルスを介在した遺伝子移入により、CHO-PDGFR 細胞  
において DynK44A を発現した後、PDGF (50 ng/mL) により刺激  
した後、内膜における CFP/YFP の経時変化を測定し、図 11 に  
25 示した。内膜において生起する FRET は、完全に失われていた。  
一方、形質膜では、DynK44A の存在下でも、DynK44A の非存在下

と同様に PDGF 刺激により Filip-pm の FRET 応答が直ちに観察された (図 12)。

以上より、内膜では、DynK44A の過剰発現により、PDGF 刺激による  $PIP_3$  増加が完全に阻害されたのに対し、形質膜においては、影響がなかったことが示された。

他のペプチドリガンド、インスリン、および上皮増殖因子による内膜内の  $PIP_3$  の増加もまた、DynK44A の過剰発現によりの過剰発現により阻害されたことから、クラスリン介在性エンドサイトーシスが、内膜における遅延性の  $PIP_3$  増加を引き起こすことが明らかになった。

#### [実施例 8]

そこで、どのようにしてエンドサイトーシスが内膜における  $PIP_3$  増加を引き起こすのかについて検討した。

内膜における  $PIP_3$  動態を詳細に調べるため、アデノウイルスを介在した遺伝子移入により、タンパク質チロシンホスファターゼ-1B (PTP1B) を CHO-PDGFR 細胞において過剰発現させた。

PTP1B は、主に ER の細胞質側の表面上に局在化されることが知られている (Frangioni, J. V., Beaham, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. and Neel, B. G. (1992) *Cell*, 68, 545-560.)。また、最近になって、PDGFR を含む受容体チロシンキナーゼがリガンドによる刺激を受けた場合、細胞表面で活性化された受容体がエンドサイトーシスにより内部移動した後、ER の細胞質側の表面において PTP1B により脱リン酸化され、不活性化されることが報告されている (Haj, F. G., Verveer, P. J., Squire, A., Neel, B. G. and Bastiaens, P. I. H. (2002)

*Science*, 295, 1708-1711.)。

筆者らは、過剰発現された PTP1B が、エンドサイトーシスされた PDGFR を選択的に脱リン酸化すること、および形質膜における PDGFR には影響を及ぼすことなく、ER の細胞質側の表面で  
5 の PDGFR による PI3K の補充および活性化を阻害することを期待した。

PTP1B を CHO-PDGFR 細胞に過剰発現させ、Fllip-em を用いて PDGF 刺激後の内膜における CYP/YFP 発光強度比の経時変化を測定し、図 1 3 に示した。PDGF 刺激による  $PIP_3$  の増加は、完全に  
10 失われていた。

一方、形質膜では、Fllip-pm を用いて検出された PDGF 刺激による  $PIP_3$  の増加は、PTP1B の過剰発現により影響されなかった (図 1 4)。これは、形質膜には PTP1B が存在しないためと考えられる。

15 以上より、 $PIP_3$  量の増加は、クラスリン被覆エンドサイトーシス小胞体により、活性化された PDGFR が内膜に内部移動され、それにより PI3K が活性化し、 $PIP_3$  が内膜で産生されたことによると示唆された。したがって、形質膜において産生された  $PIP_3$  の、エンドサイトーシス小胞体による内膜への流入は無視できる  
20 程度であり、むしろ、内膜において観察される  $PIP_3$  は内膜において in situ で産生されていることが示された。

#### [実施例 9]

PKC 由来の C1B ドメインは DAG と選択的に結合することが知ら  
25 れている。そこで、LBD としてこのドメイン選択し、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (以下 DAG-Fllip とす

る) を作製した。細胞膜および細胞内膜への局在ドメインを DGA-fllip に連結することにより、DAG-fllip-pm および DAG-fllip-em を作製した。次に、DAG-fllip-pm と DAG-fllip-em が DAG に応答することを確認するために、膜透過性を有し、C1B ドメインと特異的に結合する物質、ホルボールエステル (PMA) を用いて、DAG-fllip-pm と DAG-fllip-em を評価した。

ホルボールエステルを添加したところ、両者とも蛍光強度比が減少した。(図 15)

この結果より、DAG-fllip-pm および DAG-fllip-em が各々細胞膜および細胞内膜の DAG を可視化するプローブとして作用することが確認された。

#### 産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、*in vivo* においても高い精度で、簡便に、脂質セカンドメッセンジャーを検出・定量することを可能とする脂質セカンドメッセンジャープローブと、それを用いた脂質セカンドメッセンジャーの検出・定量方法が提供される。この発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、遺伝的にコードされた蛍光プローブであり、あらゆる脂質セカンドメッセンジャーに対して適応性を示す。

したがって、この発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを用いることにより、脂質セカンドメッセンジャーの単一生細胞における動態を可視化できるだけでなく、各種の外的刺激による脂質セカンドメッセンジャーの増加が、形質膜、内膜のいずれにおいて大きいのかや、脂質セカンドメッ

センジャーの増加がどのような機構により生じるものなののかについて明らかにできる。

受容体エンドサイトーシスは、受容体の活性化を弱める作用だけでなく、下流でのシグナリングを調整する作用も有すると考えられてきた (Vieria, A. V., Lamaze, C. and Schmid, S. L. (1996) *Science*, 274, 2086-2089. ; Ceresa, B. C. and Schmid, S. L. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 204-210. ; Lavoie, C. et al. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 35402-35410.) が、これまでは、生細胞のどの部位において、  
10 いかにして、いつ、受容体エンドサイトーシスが起こり、シグナル経路が誘発されるのかについては明らかにされていなかった。この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、脂質セカンドメッセンジャー産生の機構、タイミング、および部位に関する広範な知見を得る上で非常に有用  
15 性が高いといえる。

また、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを用いることにより、今後さらに、例えば、細胞内の異なる膜において産生される同一の脂質セカンドメッセンジャー (例えば  $PIP_3$ ) が、その結合タンパク質の種類に応じて、異なる下流シグナルを調節し、遺伝子発現、細胞代謝、および細胞骨格の調節等の、個別の細胞機能を最終的に引き出し  
20 ていることなども明らかにされるものと期待される。

## 請求の範囲

1. 脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペ  
プチドと、該ポリペプチドの両末端に、剛直なリンカー配列を  
5 介して連結された異なる蛍光波長を有する二つの発色団と、一  
方の発色団と剛直なリンカー配列を介して連結された膜局在化  
配列を有することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャー検  
出・定量用プローブ。
2. 脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペ  
10 プチドは、脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質である  
請求項 1 の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ。
3. 脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質は、GRP1 の  
プレクストリン相同ドメインである請求項 2 の脂質セカンドメ  
ッセンジャー検出・定量用プローブ。
- 15 4. 発色団は、ポリペプチドの N-末端に連結されたシアン蛍  
光タンパク質と、C-末端に連結された黄色蛍光タンパク質であ  
る請求項 1 ないし 3 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー  
検出・定量用プローブ。
5. リンカー配列は、配列番号 1 の配列の繰り返しからなる  
20 剛直な  $\alpha$ -ヘリックス状リンカーである請求項 1 ないし 4 のい  
ずれかの脂質セカンドメッセンジャー。
6. 少なくとも 1 つのリンカー配列は、ジグリシンモチーフ  
を有する請求項 1 ないし 5 のいずれかの脂質セカンドメッセン  
ジャー検出・定量用プローブ。
- 25 7. 膜局在化配列は、脂質化配列又は膜貫通配列である請求  
項 1 ないし 6 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・

定量用プローブ。

8. 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させ、蛍光波長の変化を測定することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法。
9. 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させる請求項 8 の脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法。
10. 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブと脂質セカンドメッセンジャーを共存させる請求項 8 の検出および定量方法。
11. 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、細胞内で膜に固定化され、該膜において産生される脂質セカンドメッセンジャーを検出・定量する請求項 9 または 10 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法。
12. 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物。
13. 請求項 1 2 の非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における脂



質セカンドメッセンジャーを定量する物質のスクリーニング方法。

图 1

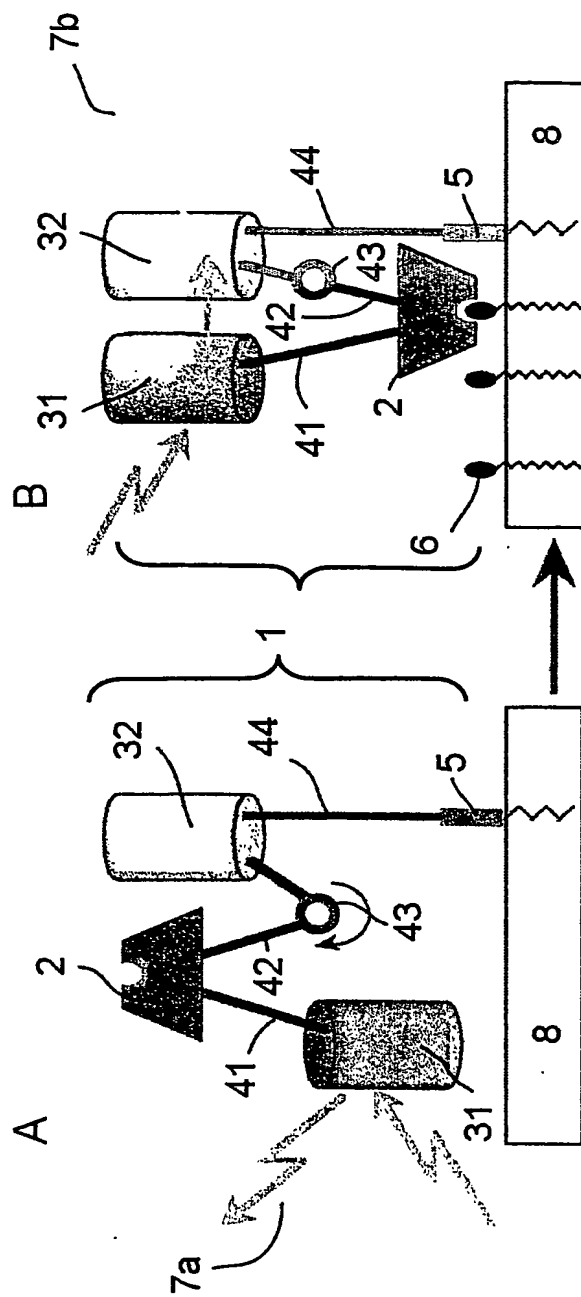


図 2

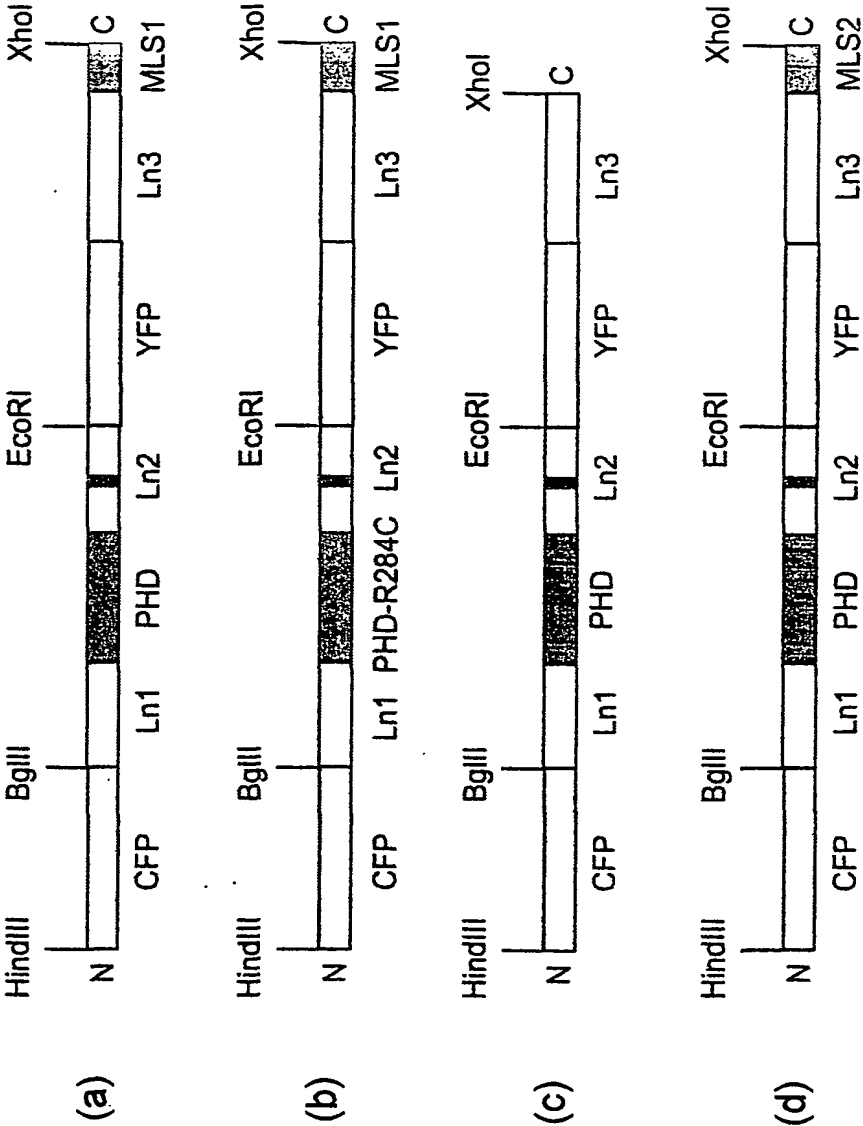


図 3

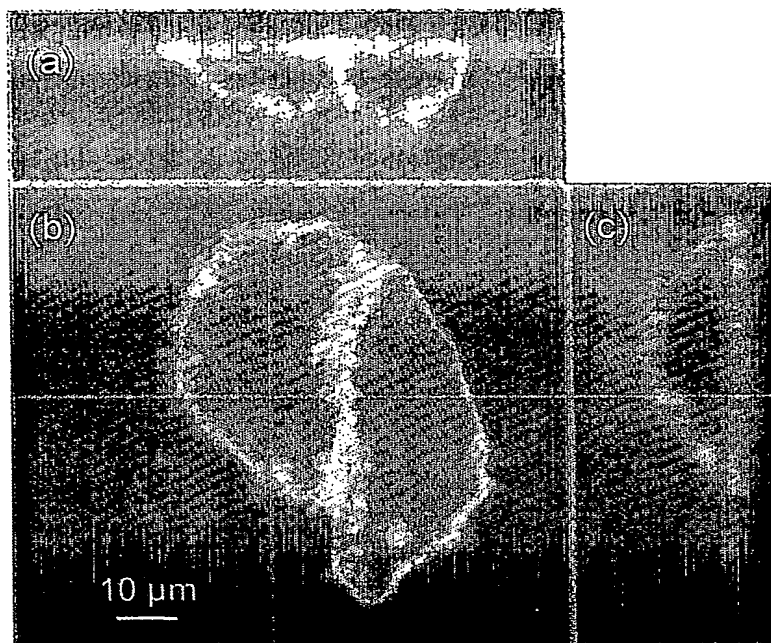


図 4

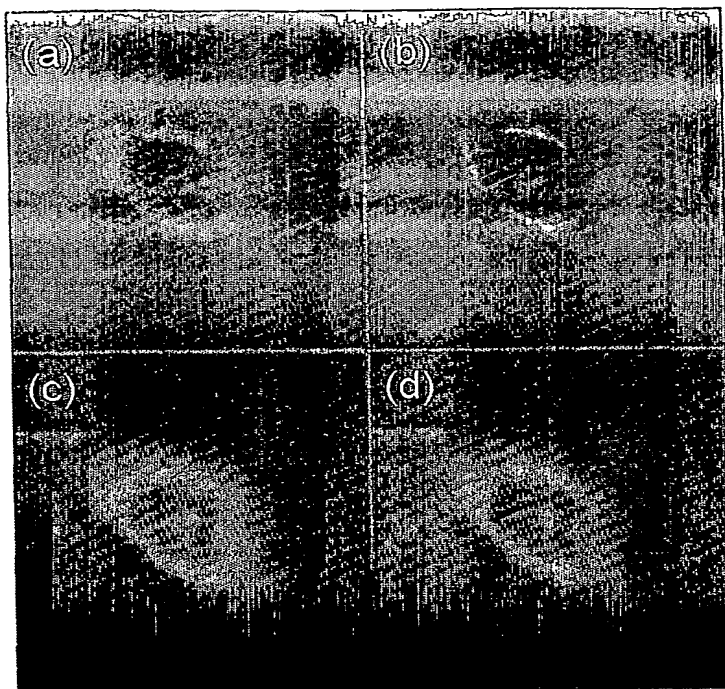


図 5

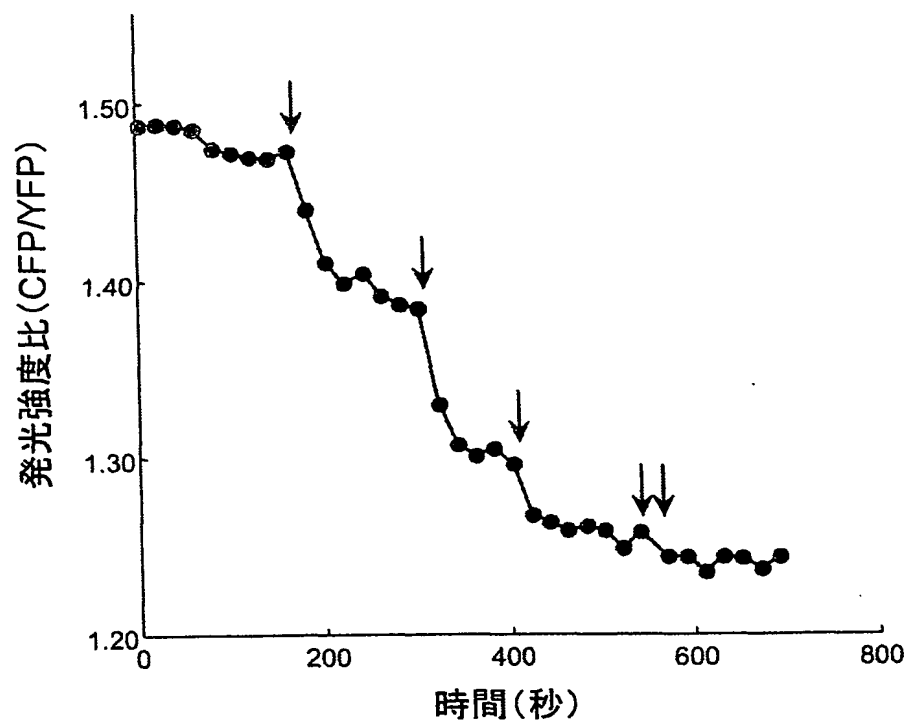


図 6

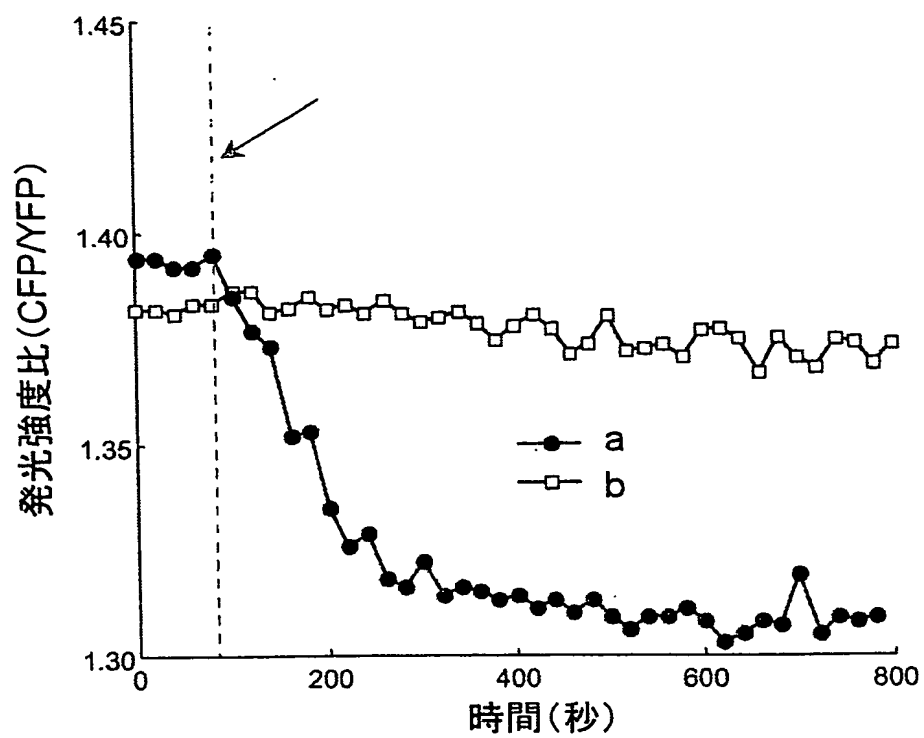


図 7

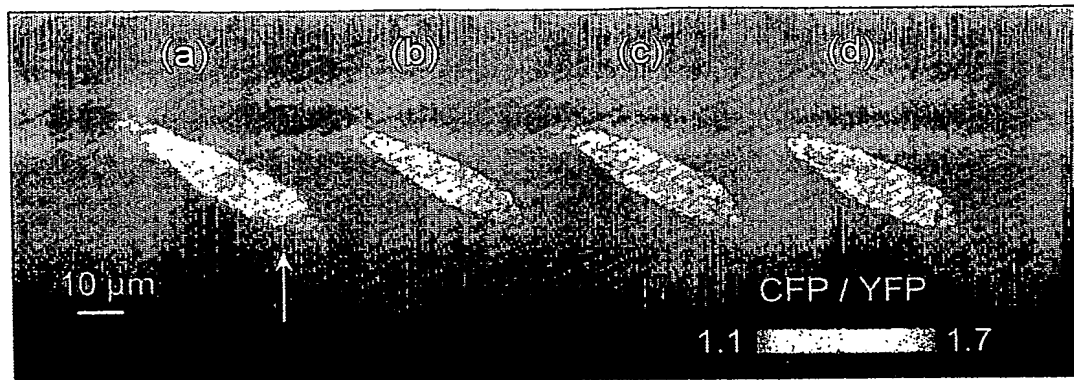




図 8

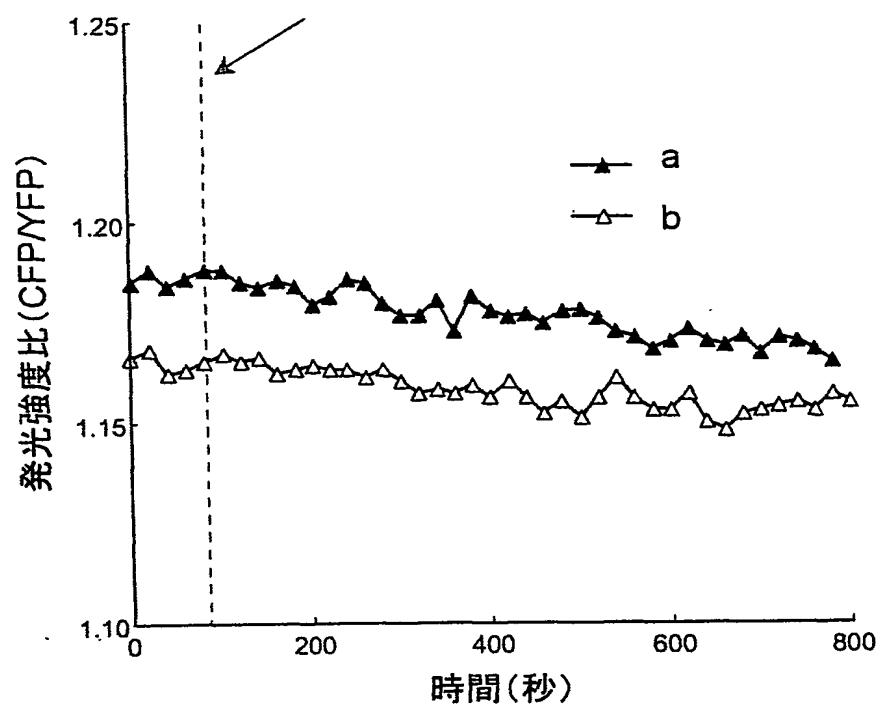


図 9

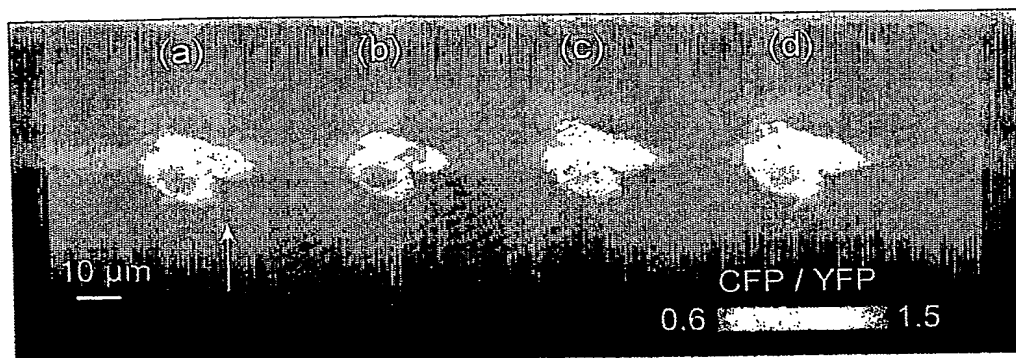


図 1 0

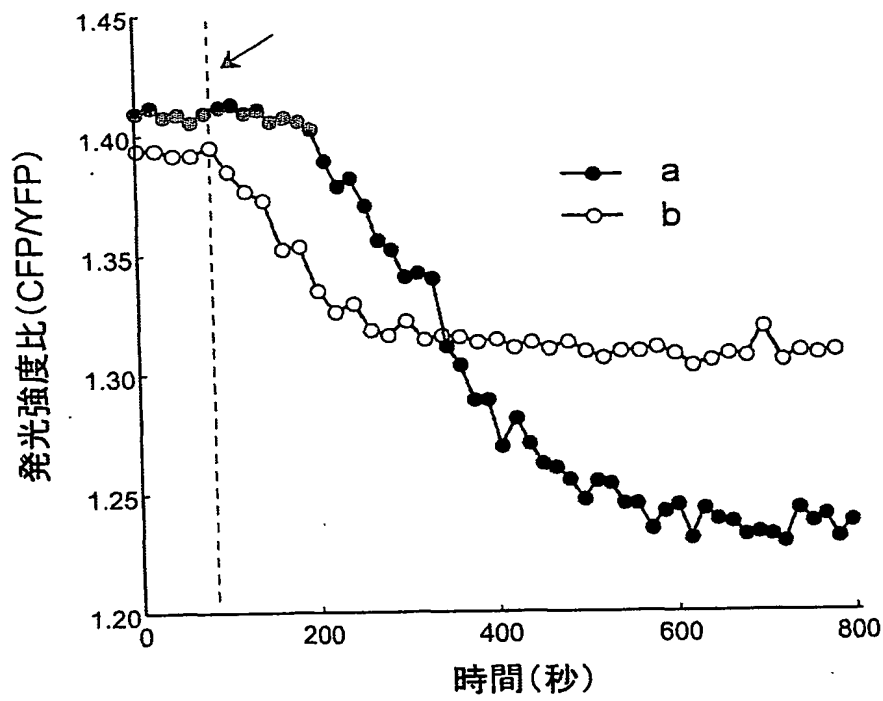


図 1 1

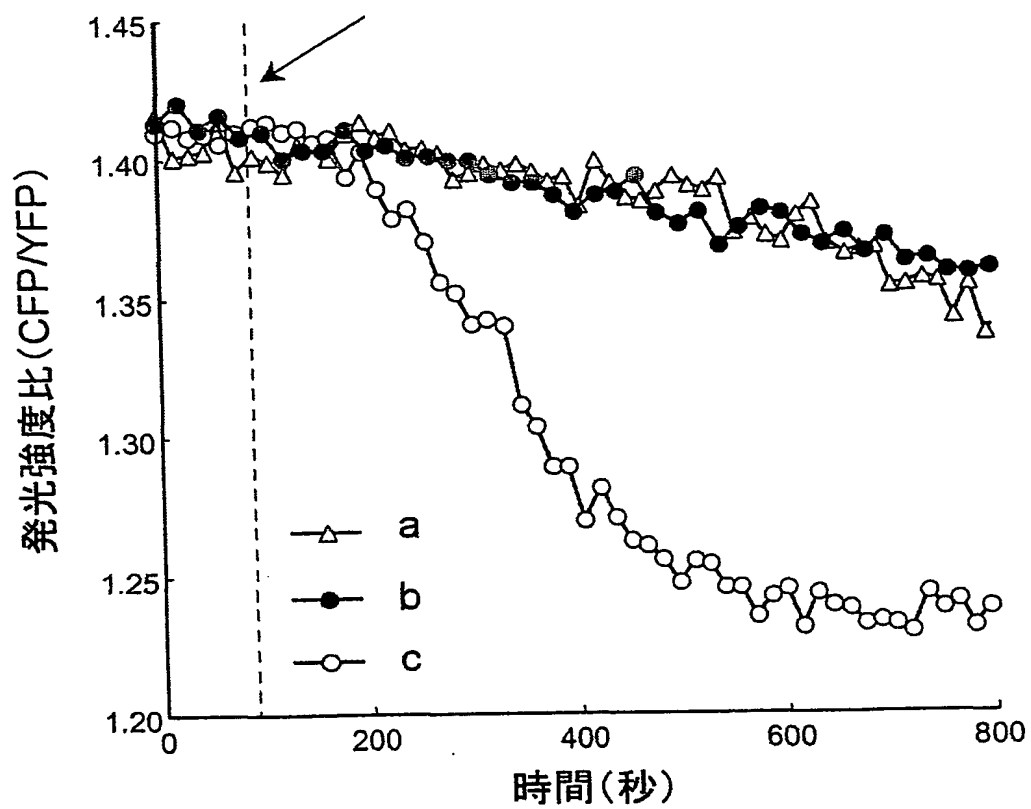


図 1 2

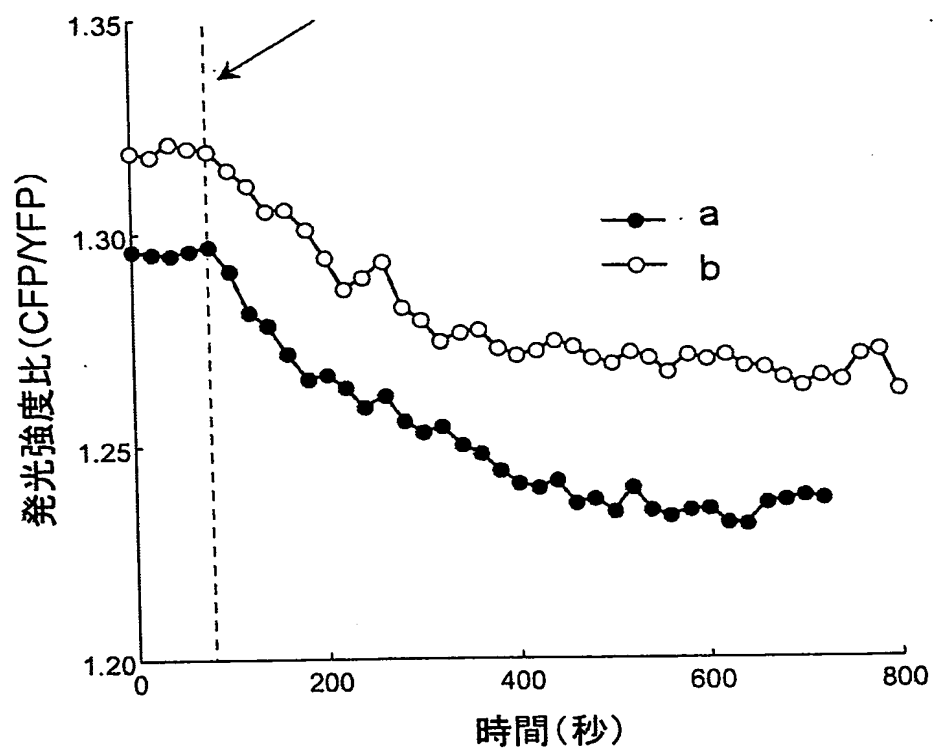


図 1 3

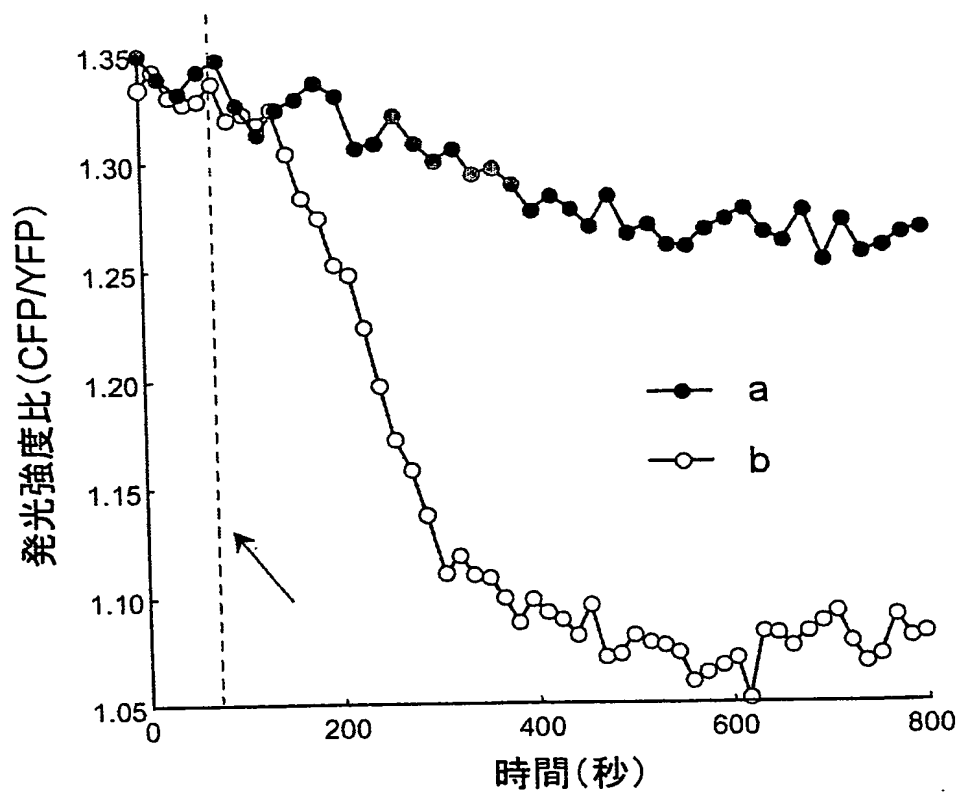


図 1 4

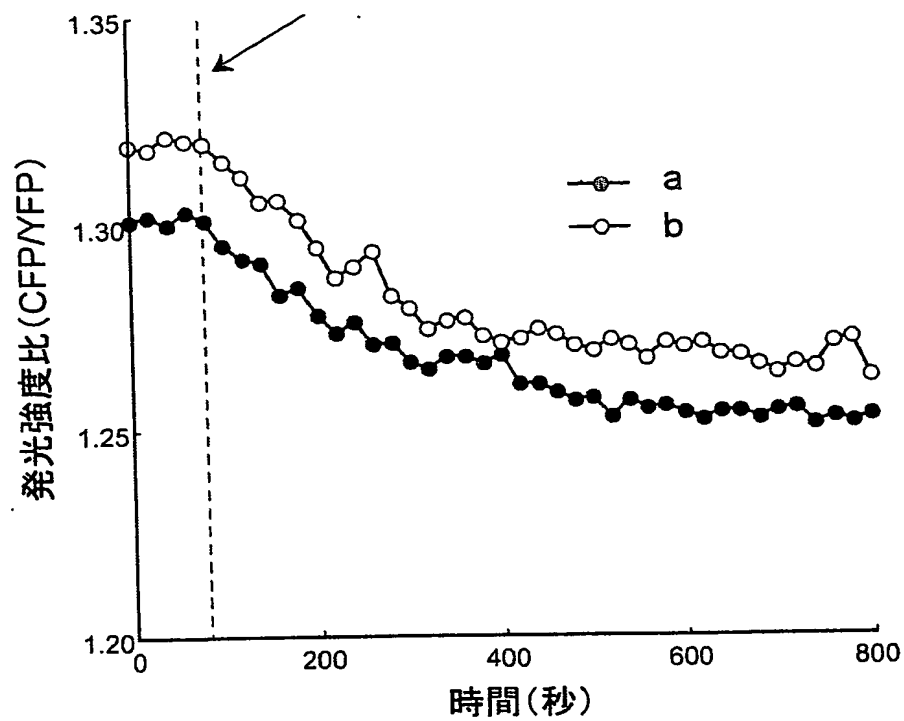
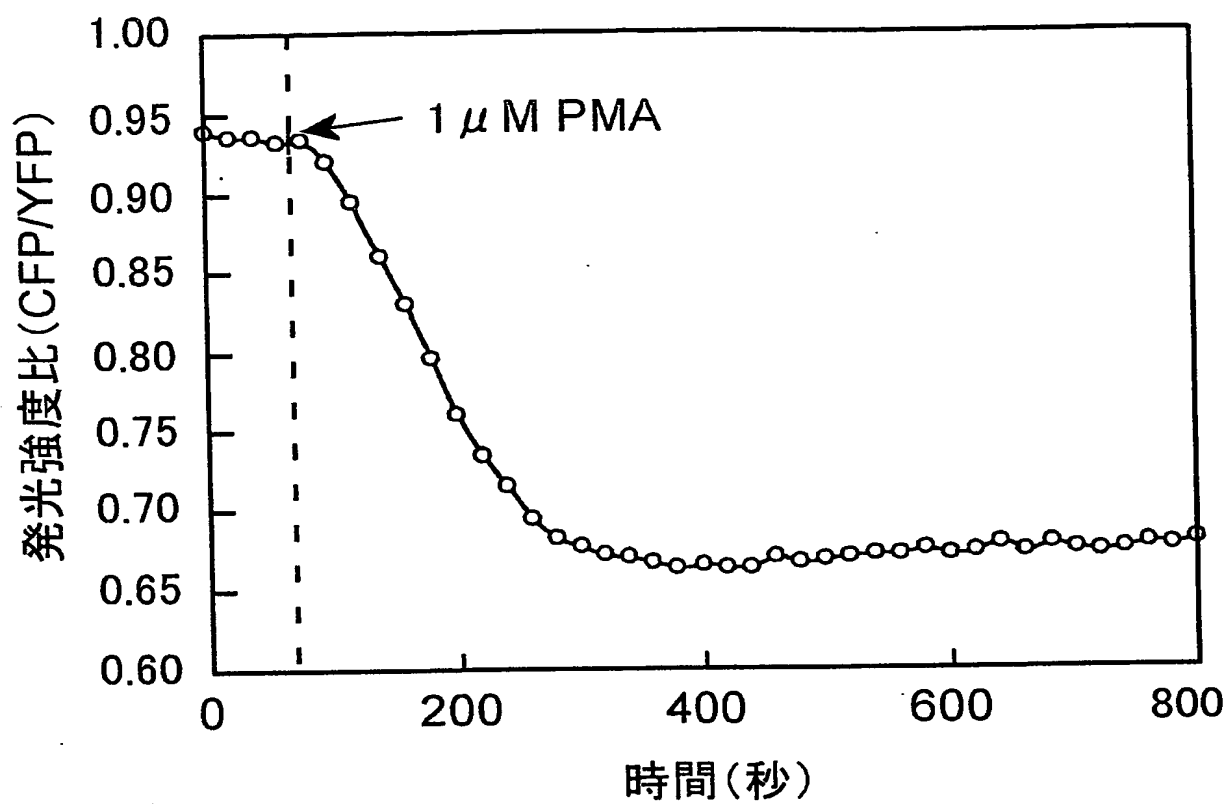


図 1 5





配 列 表  
Sequence Listing

<110> Japan Science and Technology Corporation  
 <120> Probes for Detection and Quantification of Lipid Second Messengers and Method for Detecting and Quantifying Lipid Second Messengers Using the Same  
 <130> 03-F-088PCT  
 <160> 6  
 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <223> Synthesized Oligonucleotide  
 <400> 1  
     eaaar 5  
 <210> 2  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <223> Synthesized Oligonucleotide  
 <400> 2  
     eaaar eaaar eaaar eaaar eaaar eaaar 30  
 <210> 3  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <223> Synthesized Oligonucleotide  
 <400> 3  
     eaaar eaaar eaaar ggeaa areaa areaa ar 32  
 <210> 4  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <223> Synthesized Oligonucleotide  
 <400> 4

aaaar aaaar aaaar aaaar aaaar aaaar aaaar	35
<210> 5	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Synthesized Oligonucleotide	
<400> 5	
qgcmg lpcvv m	11
<210> 6	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Synthesized Oligonucleotide	
<400> 6	
qgsmg lpcvv m	11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003433

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/533, C12Q1/68, C07K19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/533, C12Q1/68, C07K19/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JOIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Lewis C. Cantley, "The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway", SCIENCE, Vol.296, pages 1655 to 1657, (2002)	1-13
A	JP 2003-513271 A (ISIS Innovation Ltd.), 08 April, 2003 (08.04.03), & WO 00/1033199 A & EP 1226436 A & AU 1162201 A	1-13
A	JP 2003-75442 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 12 March, 2003 (12.03.03), (Family: none)	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June, 2004 (30.06.04)		Date of mailing of the international search report 13 July, 2004 (13.07.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003433

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/533, C12Q1/68, C07K19/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/533, C12Q1/68, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JOIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Lewis C. Cantley, "The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway", SCIENCE, Vol. 296, p1655-1657, (2002)	1-13
A	JP 2003-513271 A (アイシス・イノベーション・リミテッド) 2003. 04. 08 & WO 00/1033199 A & EP 1226436 A & AU 1162201 A	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 06. 2004

国際調査報告の発送日

13. 7. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献 .		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-75442 A (積水化学工業株式会社) 200 3.03.12 (ファミリーなし)	1-13